

国際医療福祉大学審査学位論文（博士）

平成 29 年度大学院薬学研究科博士課程・論文要旨

題目:情動調節およびストレス応答におけるATP感受性カリウムチャンネル
Kir6.2の関与

Involvement of K_{ATP} channels including Kir6.2 in regulation of emotional
behaviors and stress responses

医療・生命薬学専攻

学籍番号：14R3002

氏名：齋藤 淳美

研究指導教員：武田 弘志

副研究指導教員：宮川 和也

キーワード：ATP 感受性カリウムチャンネル 情動行動 モノアミン神経 ストレス HPA 系

【研究の背景と目的】

ATP 感受性カリウム (K_{ATP}) チャンネルは、チャンネルのポアを形成する内向き整流性カリウムチャンネルである Kir6.1 あるいは Kir6.2 と、調節サブユニットであるスルホニル尿素受容体から構成される異種 8 量体である。 K_{ATP} チャンネルを構成するサブユニットの中でも、Kir6.2 は脳内に広く存在しており、特に、情動行動やストレス応答に深く関与しているモノアミン神経が豊富に存在する脳部位に多く発現している。しかしながら、Kir6.2 の情動調節およびストレス応答における役割についてはこれまでにほとんど報告されていない。そこで本研究では、Kir6.2 遺伝子欠損 (Kir6.2^{-/-}) マウスの情動性やストレス応答の特徴について、行動学的および生化学的に検討した。さらに、野生型マウスを用いて Kir6.2 の脳内神経分布を確認し、機能的連関を考究することで、ストレス性精神疾患の病態解明や新たな予防および治療法の開発に向けたターゲット分子として Kir6.2 が関与し得るか検証することを目的とした。

【方法および倫理上の配慮】

実験には、C57BL/6J 系（野生型）雄性・雌性マウスおよび、Kir6.2^{-/-} 雄性・雌性マウスを用いた。Kir6.2^{-/-} マウスは、神戸大学の南博士より譲渡された。また、譲渡された Kir6.2^{-/-} マウスについては、中脳より抽出した遺伝子を用いて、PCR 法により Kir6.2 遺伝子の改変を確認した。なお、実験の実施に当たっては、実験動物に対する動物愛護上の問題に配慮し、本学の動物実験委員会承認のもと、「国際医療福祉大学動物実験規程」および「動物実験に関する日本薬理学会指針」を遵守して、適正な実験動物の飼育と動物実験を実施した。また、遺伝子改変動物の取り扱いについては、本学の組換え DNA 実験安全委員会承認のもと、「国際医療福祉大学組換え DNA 実験安全管理規程」および「カルタヘナ法」を遵守した。

1. Kir6.2^{-/-} マウスの情動的特徴と脳内モノアミン神経系との関連

1) Kir6.2^{-/-} マウスの情動性に関する行動学的評価

Kir6.2^{-/-} マウスの自発運動量、一般情動行動、不安様行動および運動協調性について、自発運動活性測定試験、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、明暗探索試験およびロータロッド試験に従い検討した。

2) Kir6.2 の脳内モノアミン神経における局在

灌流固定した野生型マウスの全脳より脳切片を作成し、背側縫線核、腹側被蓋野および青斑核における Kir6.2 とトリプトファン水酸化酵素 (TPH) およびチロシン水酸化酵素 (TH) の局在について、免疫組織化学的染色法に従い検討した。

3) Kir6.2^{-/-} マウスの脳内モノアミン神経機能

野生型マウスおよび Kir6.2^{-/-} マウスの中脳サンプルを採取し、TPH および TH タンパク質の発現量を Western blot 法に従い定量解析した。

2. Kir6.2^{-/-} マウスのストレス応答

1) Kir6.2^{-/-} マウスの急性ストレス刺激に対する反応性

マウスに 1 時間の拘束ストレス刺激を負荷した直後に断頭採血し、遠心分離により得られた血清を用いて、コルチコステロンの血中濃度を競合的酵素免疫測定法に従い測定した。

2) 海馬グルココルチコイド受容体 (GR) 陽性細胞における Kir6.2 の局在

灌流固定した野生型マウスの全脳より脳切片を作成し、海馬 CA1 および歯状回 (DG) における Kir6.2 と GR の局在について、免疫組織化学的染色法に従い検討した。

【結果および考察】

1. Kir6.2^{-/-} マウスの情動的特徴と脳内モノアミン神経系との関連

Kir6.2^{-/-} マウスの情動行動について検討した結果、雄性および雌性 Kir6.2^{-/-} マウスともに、特に暗期において自発運動量の有意な低下が認められた。また、雄性 Kir6.2^{-/-} マウスでは、オープンフィールド試験における中央区画滞在時間割合と総移動距離の有意な減少、高架式十字迷路試験における open arm 滞在時間割合の有意な低下および明暗探索試験における明区画での移動距離の有意な減少が認められた。さらに、雌性 Kir6.2^{-/-} マウスでは、オープンフィールド試験における立ち上がり回数の有意な減少、高架式十字迷路試験における open arm 滞在時間割合の有意な低下および明暗探索試験における明区画での滞在時間の有意な減少が認められた。これらの結果から、Kir6.2 の欠損により、情動性の低下および不安感受性の亢進が惹起されることが明らかとなった。また、ロータロッド試験において、雄性および雌性 Kir6.2^{-/-} マウスともに、運動調節機能の障害が認められたことから、Kir6.2^{-/-} マウスにおける情動性の低下と不安感受性の亢進に運動協調性障害が一部影響を及ぼしている可能性が考えられた。

脳内モノアミン神経における Kir6.2 の局在について検討した結果、背側縫線核では TPH 陽性細胞上に、腹側被蓋野および青斑核では TH 陽性細胞上に Kir6.2 が発現していた。さらに、中脳における TPH および TH のタンパク質発現量について検討した結果、雄性 Kir6.2^{-/-} マウスでは変化が認められなかったものの、雌性 Kir6.2^{-/-} マウスでは TPH タンパク質発現量の有意な増加が認められた。これらの結果から、Kir6.2^{-/-} マウスにおける情動行動変化の発現には、脳内モノアミン神経系の機能変化が一部関与している可能性が示唆された。

2. Kir6.2^{-/-} マウスのストレス応答

急性拘束ストレス刺激を負荷した結果、野生型マウスでみられる血中コルチコステロン濃度の上昇は、Kir6.2^{-/-} マウスにおいて有意に増強され、特に雌性 Kir6.2^{-/-} マウスにおいて顕著であった。また、海馬 CA1 および DG において、Kir6.2 と GR の局在について検討した結果、GR 陽性細胞上に Kir6.2 の発現を確認した。これらの結果から、Kir6.2 の欠損により HPA 系の調節機能に異常が生じ、ストレス応答に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

【結語】

本研究で得られた知見より、脳内モノアミン神経系および HPA 系を介した情動調節およびストレス応答において、Kir6.2 が重要な役割を担っている可能性が示唆された。本研究成果が、ストレス性精神疾患の病態解明や新たな予防および治療戦略の提唱に寄与することを期待する。